

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-1535

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>  
G 01 N 27/327

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月5日

7363-2G G 01 N 27/30 353 J  
7363-2G 27/46 336 \*

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全21頁)

⑮ 発明の名称 水溶液中の酵素脱水素可能な化学的種の測定のためのセンサー

⑯ 特願 昭63-251736

⑰ 出願 昭63(1988)10月5日

優先権主張 ⑯ 1987年10月5日 ⑯ 米国(US) ⑯ 104862

⑯ 発明者 カーター・アンダーソン アメリカ合衆国ミネソタ州55417ブルツクリンパーク・シツクスティセブンスウェイ 6057

⑯ 発明者 デビッド・シー・ソジン アメリカ合衆国ミネソタ州55408ミネアポリス・アービングアベニューサウス 2654

⑯ 出願人 アーデン・メディカル・システムズ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ミネソタ州55113ローズビル・ロングレイクロード 2675

⑯ 代理人 弁理士 小田島 平吉  
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

水溶液中の酵素脱水素可能な化学的種の測定のためのセンサー

2. 特許請求の範囲

1. キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

2. 脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液で

ぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

3. NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマー、メチレンブルーおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなることを特徴とする電極コーティング組成物。

4. NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマー、ポリビニルビロリドン、硬化したポリ酢酸ビニルラテックスおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなるコーティングをその上に有する導電性本体からなることを特徴とする感知装置のための電極。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、医学的装置に関する。とくに、本発明は、水溶液、とくに体液、例えば、全血液、血

尿および尿の中の酵素脱水素可能な物質、例えば、グルコースのレベルを、アンペア的に、測定するために使用する、臨床化学的分析装置に関する。

患者の血液または他の体液中のある種の化学的物質および/または生物学的物質のレベルを精確に、信頼性をもって、かつ迅速な情報を得ることが、現代の診断医学において、要求されている。

最も普通の決定の1つは、血液または尿中のグルコースの決定であり、そして、便宜上、以後の説明はグルコースのレベルの決定に集中される。

一回使用の通知装置を利用するこのような分析のために有用なシステムは、1987年3月31日付けの米国特許第4,654,127号(リチャード W. ベイカーおよびロウジャー L. フンク) (その開示を引用によってここに加える) に記載されている。

米国特許第4,654,127号の装置において、体液、例えば、血液または尿の試料を多室の受器の1つの室に入れ、一方目盛り定め瓶の液体

直接電流に変換されないが、むしろ、コファクター、例えば、NADH (NAD<sup>+</sup>の還元された形態ニコチニアミドアデニンジヌクレオイド)、および仲介物質を含む反応の機構による。このようなシステムの一般的な化学は、次の論文において論じられている: ロ・ゴルトン (L. Gortton)、「ニコチニアミド補酵素の電気触媒的酸化のための化学的変性した電極 (Chemical Modified of Nicotinamide Coenzymes)」、J. Chem. Soc. Faraday Trans. I., 1986, 82, 1245-1258 (その開示を引用によってここに加える)。ロ・ゴルトン (L. Gortton) の論文における反応機構は、次によって表わされる:



ここで  $SH_2$  および  $S$  は、その濃度を決定すべき種の、それぞれ、水素化および脱水素された形態を表わし、そして  $M_{ox}$  および  $M_{red}$  は、それ

を受器の他の室に入れる。次いで、センサーの電極へ、まず、目盛り定め瓶の液体を流れさせ、次いで試験試料を流れさせる。液体とセンサー電極との間次の接触は電流を発生させ、この電流を測定しつつ関係づけて、試験液体中の特定の物質の濃度に関する所望の情報を得る。次いで、キャリヤー (carrier) を廻渉する。

米国特許第4,654,127号のシステムにおけるセンサー電極の各々は、ポリマーおよび電気的活性種を含むコーティングを有するものとして開示されており、ここでポリマーはセンサーの活性区域にわたって膜をつくり、そしてシステムの導電性表面に近くに電気的活性種を固定化する機能を有する。

また、溶液中のそのレベルを測定すべきある物質、例えば、グルコースは、適当なデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に脱水素に対して感受性であること、およびこのような脱水素は電子を遊離し、これによって測定可能な電流を発生することは知られている。ほとんどの場合において、脱水素は

それ、仲介物質の酸化されたおよび還元された形態を表わす。

グルコースのレベルの電気化学的検出のための最も普遍のアセイの系は、グルコースオキシダーゼの存在下に分子状酸素によりグルコースを酸化して、グルコール酸および過酸化水素を生成することを含む。電気化学的検出は、酸素の消耗に、あるいは過酸化物の発生に関係づけることができる。

いずれの場合においても、この機構の主要な欠点は酸素の利用可能性における制限である。この制限は、試験液体において直面することが期待される濃度の所望の直線の範囲のために、過剰な酸素の供給を保証するために、予め希釈を必要とする。さらに、全血液の測定は、ヘモグロビンの酸素吸収能力のために、精確に測定することが非常に困難である。

あるいは、先行技術は、化学反応において酸素の代わりに仲介物質を使用し、これはセンサー電極上の膜またはコーティング中に挿入されて、予

偏析の必要性を排除した。ベンゾキノンを仲介物質として選択する場合、グルコースとベンゾキノンとのグルコースオキシダーゼの存在下の反応はグルコール酸およびハイドロキノンを生成する。

この別法は、所望の（および測定する）反応がグルコースと分子状酸素との前述の反応と競争するという欠点を有する。こうして、異なる酸素濃度をもつ試料は、同一のグルコース濃度において異なる培養の応答を生成することがある。この妨害は全血漿の測定において最も顕著である。

本発明の1つの面によれば、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度をその溶接中ににおいてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵

を、例えば、アンペアに翻訳するために必要な成分のすべては、グルコース含量の期待する直線の範囲のために適切な供給で、コーティング中に配合される。こうして、試料の予偏析は不要である。

さらに、酵素は測定において含まれず、そして酸素の濃度はそれに影響を及ぼさない。

コーティング中のメチレンブルーの存在は、低い印加電圧における検出および測定を可能とし、こうしてより高い電位において酸化に感受性でありうる種からの妨害を排除する。

本発明のコーティングされた電極は、急速に応答し、2分以下の精確な測定を可能とする。

最後に、膜の組成物は水溶液中に可溶性でなく、そして信頼性ある測定の実施を可能するために十分に長い期間の間その一体性を保持する。アニオン性バーフルオロスルホン酸ポリマーはカチオン性メチレンブルーを膜に結合すると信じられる。

本発明の感知電極は測定アノードであり、好ま

るからなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前述感知装置が提供される。

本発明の他の面によれば、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり。前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前述方法が提供される。

好ましくは、コーティング組成物は、また、水溶性樹脂のポリマー、例えば、ポリビニルビロドン（P V P）および水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックス接着剤を結晶する。

本発明のシステムにおいて、グルコース含量

しくは单一のカソードおよび地面上に電子を伝達する並列の2つの別々のアノードの1つである。他のアノードは、「バックグラウンドアノード」と呼び、カソードおよび地面上に一定の電圧を維持する。こうして、この分野において知られているように、試験溶液に暴露されることによって起こる測定アノードにおける状態およびその上の電子の発生の変化は、アノードおよびカソードの間に印加する電圧に無視できる影響のみを有する。

測定アノードおよびバックグラウンドアノードの両者は、好ましくはグラファイトから作る。カソードは、好ましくは、銀から作り、そして塩化銀のコーティングを有する。前述のコーティング組成物でコーティングされるのは測定電極のみである。

バーフルオロスルホン酸ポリマーが唯一の樹脂成分であるコーティング組成物において、コーティングは目盛り定め剤（calibrant）の液体および試験液体のそれを通過する急速な移

送のためには密でありすぎる。こうして、このような組成物はより速い試験において使用することができるが、急速な読みを提供することを意図するシステムにおいては好ましくない。

コーティング組成物が、また、水溶性樹脂のポリマーを含む好ましい実施店様において、コーティング組成物は目盛り定め液および試験溶液のそれを通す急速な移送を可能とする。

好ましい組成物は、また、乾燥のとき架橋したこぞうたいを形成する、水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックスを含有し、これによって改良された一体性を組成物に与える。

第1図は、本発明の感知装置10の全体の構成を示す。この装置は、強靭な、非導電性プラスチック材料、例えば、アクリロニトリル-バタジエン-スチレン-コポリマー(A B S)から作られた、剛性のカードの形態キャリヤー11、およびその一端をカバーする板12を含む。板12は、一般に、透明なプラスチック材料から作られる

に取り付けられており、そして内部の壁24を有し、この壁はシリンダーを、目盛り定め液液体を含有する目盛り定め剤室26と血液または他の体液の試料を受取る試料室27とに分離する。目盛り定め剤溶液は室26内に工場で密閉され、そしてセンサーによって測定すべき、既知濃度のグルコースを含有する。キャップ28は、ウェブ29によってシリンダー23へ接続されており、そして試料室27が体液試料を受取った後、シリンダー23の上端より上に配置される。

測定アノード21は、第2図に断面図で示されており、グラファイトプラグ31、好ましくはグラファイトプラグから切ったシリンダーからなり、このプラグはカソード11のプラスチック材料中に孔を通して延びている。図またはコーティング32は、プラグ31の1つの表面をカバーし、そしてそこから短い距離でプラグを取囲むモート33に至る。キャリヤー11の両方の面における導電性トラック34は、測定アノードにおいて発生した電子を感知装置内の接点へ導き、そし

が、透明性は必須ではない。

キャリヤーの一端に、板より下に、毛管通路13が存在し、これはS字形であり、そしてキャリヤー11の上表面と実質的に平坦なS字形カバーの下表面との間の狭い空間によって定められる。毛管通路13は入口端14と出口端16との間を走行する。入口端に、「プラウ(p l o w)」と呼ぶ、S字形の毛管通路のカバーの上昇した部分17が存在する。そのプラウの機能は、後述するように、目盛り定め液および試験溶液を保持するはくに孔を開け、そしてこれらの溶液を、連続直に、毛管通路の入口14に入らせることである。バックグラウンドアノード18、カソード19および測定アノード21は、毛管通路内に、その入口に接続して、存在し、そして各々は、測定アノード21について第2図に示すように、「モート(m o a t)」33によって取囲まれている。

円筒形ガイドスリーブ22は、入口17より上に板18の1つの角に取り付けられている。多室シリンダー23はスリーブ22内に回転するよう

て完極的に所望の読みを提供するマイクロプロセッサへ導く。

バックグラウンドアノード18は、コーティングまたは膜をもたない以外、測定アノード21に類似する。カソード19はキャリヤー11を通して延びる端のプラグであり、その上表面は塩化銀の薄い層でコーティングされている。

コーティング32は、前述のように、少なくともグルコースデヒドロゲナーゼ(グルコースが測定すべき化学種であるとき)、メチレンブルー【3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン-5-イウムクロライド】およびバーフルオロスルホン酸ポリマーからなる。

使用できる過当なバーフルオロスルホン酸ポリマーは、少なくとも約900の等価重量(equivalent weight)を有するものである。少なくとも約1100の等価重量は好ましい。

バーフルオロスルホン酸溶被は、イー・アイ・デュポン社から商標ナフィオン(Nafion

●) で商業的に販売されており、そして、また、マーチン (Martin) らの手順 [Anal. Chem., Vol. 54, 1639 (1982)] によって調整することができる。

好ましくは、コーティング組成物は、また、水溶性樹脂のポリマー、例えば、ポリビニルピロリドンを含有する。この材料の存在は、コーティングまたは膜を、試験溶液の透過性をよりよくし、そして読みをより速くする。

ポリビニルピロリドン (PVP) が水溶性ポリマーであるとき、それは、一般に、約 1000 を越える、好ましくは約 2000 を越える平均分子量を有する。

使用できる他の適当なポリマーは、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴムなどを包含する。

さらに、好ましいコーティング組成物は、また、水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックス接着剤を含有する。この物質

のための細い境界を形成し、その広がりを結構に電極の区域に限定する。

グラファイトは油性または疏水性の表面を有するが、驚くべきことには、水性コーティング組成物はそれによってはじかれること、およびコーティングは、乾燥後、それに接着性であることがわかった。

コーティングを乾燥すると、それは、典型的には、コーティングの 1 g につき、約 100 ~ 約 150 単位のグルコースデヒドロゲナーゼ、約 10 ~ 約 15 重量% の NAD<sup>+</sup>、約 10 ~ 約 15 重量% のメチレンブルーおよび約 10 ~ 約 15 重量% のバーフルオロスルホン酸ポリマーを含有する。さらに、コーティングは、0 ~ 約 10 重量%、好ましくは約 5 ~ 約 10 重量% の水溶性ポリマー、および 0 ~ 約 10 重量%、好ましくは約 5 ~ 約 10 重量% の硬化したエマルジョン接着剤を含有する。

コーティングは、乾燥後、一般に、約 1 ~ 約 2 mm、好ましくは約 1 ~ 約 1.5 mm の厚さ

は、決定酵母のとき架橋して硬化し、これによって追加の一体性を決定酵母したコーティングに付与し、コーティングが試験溶液で潤滑したときの崩壊を少なくすると思われる。

使用できる他の水性エマルジョン接着剤は、アクリレートおよびメタクリレートエステルのラテックスポリマーを包含する。

約 1000 の使い捨てキャリヤーのための測定アノードの調製に十分な、典型的なコーティング組成物は、約 2000 ~ 約 3000 単位のグルコースデヒドロゲナーゼ、約 0.2 ~ 約 0.5 g のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、約 0.01 ~ 約 0.03 g のメチレンブルーおよび約 1 ~ 約 2 ml のバーフルオロスルホン酸ポリマーを 1.25 重量% のポリマーを含有するメタノール中の溶液として含有する。

コーティング組成物を測定電極の上表面に適用し、次いで乾燥させる。測定電極を取囲むモートは、電極のへりにおいて鋭い表面を形成し、これによって、表面張力により、コーティング組成物

を有する。

特定の実施態様において、約 1000 の電極のためのコーティング組成物は、次の成分からなる：

1) グルコースデヒドロゲナーゼ、2610 単位、

2) ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、ナトリウム塩、0.348 g、

3) メチレンブルー、0.0204 g、

4) ポリビニルピロリドン (水中 1%)、1.517 g、

5) ポリ酢酸ビニルラテックス (水中 2.1%)、0.453 g、

6) バーフルオロスルホン酸ポリマー (水中 1.25%)、1.532 ml。

グルコースデヒドロゲナーゼ、NAD<sup>+</sup> およびメチレンブルーを、まず、水性ポリビニルピロリドン溶液中に攪拌しながら溶解する。次いで、ポリ酢酸ビニルラテックスを、完全に配合するまで攪拌しながら、添加する。組成物が攪拌されてい

る間、パーカルオロスルホン酸ポリマー溶液を滴々添加する。1~2分にわたる、この成分のゆっくりした添加は、ポリマーをコーティング組成物内に均勻に分散させるために必要である。

この段階におけるコーティング組成物の外観は、一般に、非常に暗い青であり、分散した微細な黒い粒子を含む。

操作における測定電極の性質を、第3図および第4図に示す。第3図は2種類の試験に関する。それは、第1試験において、電極におけるアンペアを示し、電極が、まず、5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め溶液に曝露され、次いで(120秒後)2ミリモルのグルコースを含有するようにつくられた試験溶液に曝露されると、アンペアは変動する。第2試験は、同様であるが、試験溶液は20ミリモルのグルコースを含有するようにつくられる。

第3図の左の曲線を左から右に読むと明らかのように、電極は、最初、不規則な未知の遮気的「ノイズ」の理由によって、少量の電流(約1ミ

前述の特定のコーティング組成物を使用して作られた。第3図の試験において使用した特定のシステムについて、試験溶液のアンペアの読みについての最適な時間は、目盛り定め溶液の解放後約180秒および試験溶液の解放後約60秒である。他のコーティング組成物を使用すると、最適な読み取り時間は目盛り定め溶液の解放後2分的に短い時間から数時間までに変化するであろう。

第4図は3種類の別々の曲線を含み、そして次の3種類の目盛り定め液について、電位を変化させたときの測定電流の変動を示す: グルコースを含有しない目盛り定め液、および5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め液(それぞれ、曲線AおよびB)(このシステムにおける両者はアノード上のコーティングがメチレンブルーを含有しない)、および曲線Bにおけると同量のグルコースを含有するが、コーティングが前述の実施例において記載した量のメチレンブルーを含有する目盛り定め液。

リアンペア)を発生し、そして電流は、約60秒以内に、目盛り定め溶液が電極に到達するにつれて、3ミリアンペアに近くまで上昇する。

試験溶液が解放されると、約120秒後、混合作用によるアンペアの間接的なわずかの上昇が存在し、次いで、試験溶液が目盛り定め溶液を希釈し、そのグルコース含量を低下させるにつれて、アンペアは一定して低下する。

これと対照的に、右の曲線は、また、目盛り定め溶液が電極に到達するときの、最初の60秒間のアンペアの増加を示す。これに引きいて、第2試験溶液が解放されると、120秒後、アンペアは大きく増加し、試験溶液が目盛り定め溶液中に配合され、それと置換されると、溶液のグルコースは上昇しはじめる。約180秒の後、約10ミリアンペアのピークアンペアが得られ、この時、この装置のよってアンペアが読み取られ、そして目盛り定め溶液についてのアンペアの読みと関係づけられて、試験溶液の所望の読みが得られる。

理解できるように、曲線AおよびCの間ににおいて、曲線AおよびBの間ににおけるより、大きい差が存在し、そして曲線Aにおける電流のレベル(グルコースに起因しない電流を示す)はより高い電圧において許容されないほどに高い。こうして、コーティング組成物中のメチレンブルーの存在は、その不存在において得ることができるよりも、より大きい精度および精度を試験に与える。最適な結果は約0.2~約0.4ボルトの電位を付与したとき得られる。

第5図は、極端な精度が読みの速さを犠牲にして得られるとき、有用である本発明の他の実施例を示す。第5図において、第2図に類似する要素は同様な参照数字を有し、そして理解できるように、この実施例における反応成分含有コーティング32グラファイトアノードおよび適用した試験溶液と直接接触しない。むしろ、反応成分含有コーティングはパーカルオロスルホン酸ポリマーの2層41および42の間に挟まれる。水性媒質中の崩壊に対するパーカルオロスルホン酸ポ

リマー層の抵抗は、試験液体のアノードへの投送を遅くし、そしてコーティングのアセンブリーに一体性を付与するので、コーティングのアセンブリーは要求するより長い接触期間のために接着性を保持する。

第5図の実施店様は、例えば、極端な精度を保証しつつ読みの測度が二次的な重要性をもつ決定、例えば、血液中のエチルアルコールのレベルの決定にとくに有用である。

以下の表は、電流を発生するためにグルコースオキシダーゼ反応を利用する、商業的に入手可能なグルコースのアンペア測定システムと比較した、本発明のシステムの性能の特性を提供する。

| 電        | 先行技術の | 本発明の |
|----------|-------|------|
| 精度       | システム  | システム |
| 血液       | 3-8%  | 3-5% |
| 全血液      | 6-10% | 3-5% |
| 全血液を使用する |       |      |

し、これによってプラウ17による孔開けによって室26の底において箔のシールを破り、そして室26から目盛り定め剤の液体を毛管通路13の中に流入させ、ここで目盛り定め剤の液体は3つのすべての電極18、19および21と接触する。目盛り定め剤の液体の流れが、液体ヘッドの減少および表面張力のために、停止したとき、目盛り定め剤の試験の読みを分析装置によって目盛り定め剤のグルコースレベルに応答して行う。いったんこの読みがなされると(一般的に約一秒後)、キャップ28およびシリンダー23をもう一度この時は180°だけ試料の試験位置へ回し、ここで室27の底における箔のシールをプラウ17によって孔開けし、そして試験液体は毛管通路13の入口14の中に流入する。

試験液体は、この時点において、電極18、19および21を含有する毛管通路3の部分において目盛り定め剤液体を置換する。毛管通路中の試験液体の流れは、また、液体ヘッドの減少および毛管作用のために、停止し、そして最後の測定は

|          |          |                 |
|----------|----------|-----------------|
| 最低の検出レベル | 3ミリモル    | 1ミリモル以下         |
| 最高の検出レベル | 20ミリモル   | 30-35ミリモル       |
| 酵素の妨害    | 大きい、酵素なし | の抑制信号           |
| 全血液を使用する |          |                 |
| 温度の影響    | 大きい      | 酵素のシステムのわずかに1/4 |
| 精確さ      |          |                 |
| 血液       | ±1ミリモル   | 1ミリモル以下         |
| 全血液      | ±1.5ミリモル | 1ミリモル以下         |

操作において、まず、体の試料を室27に挿入し、次いで室をキャップ28で密閉し、そして感知装置における適当なスロット中にこのカードアセンブリーを挿入する。次いで、キャップ28およびシリンダー23を開始位置から90°だけ回

分析装置によってなされる。センサーの読みに基づいて、目盛り定め剤の液体が測定電極21と培地したときおよび試験液体が測定アノード21と接触したとき、分析装置は試料液体中のグルコースの濃度を誘導する。

本発明は、主として、グルコースレベルの決定に関して説明した。しかしながら、本発明は、適当なデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に脱水素される他の化学種、例えば、エタノール、乳酸塩などを検出するために使用できる。

本発明を好みの実施店様を参照して説明したが、本発明の教示および範囲を逸脱しないで、種々の変化および変更が可能である。

本発明の主な恩恵および特徴は、次の通りである。

1. キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して選択性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用

するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、ペーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

2、前記酵素はグルコースデヒドロゲナーゼである上記第1項記載の感知装置。

3、前記コーティング組成物は水溶性樹脂のポリマーを含有する上記第1項記載の感知装置。

4、前記水溶性樹脂のポリマーはポリビニルビロリドンからなる上記第3項記載の感知装置。

5、前記コーティング組成物は水性エマルジョン接着剤を含有する上記第1項記載の感知装置。

6、前記接着剤はポリ酢酸ビニルラテックスからなる上記第1項記載の感知装置。

7、前記コーティングは約～約 $\mu\text{m}$ の厚さを有する上記第1項記載の感知装置。

8、前記コーティングは、約～約 $\mu\text{m}$ の単位/ $\mu\text{g}$ のグルコースデヒドロゲナーゼを含有し、そ

して約～約重量%のNAD<sup>+</sup>、約～約重量%のペーフルオロスルホン酸ポリマーおよび約～約重量%のメチレンブルーを含有する上記第2項記載の感知装置。

9、前記コーティングは、さらに、約～約重量%のポリビニルビロリドンおよび約～約重量%の硬化したポリ酢酸ビニルを含有する上記第8項記載の感知装置。

10、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶性中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、ペーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

約～約重量%のNAD<sup>+</sup>、約～約重量%のペーフルオロスルホン酸ポリマーおよび約～約重量%のメチレンブルーを含有する上記第15項記載の方法。

17、前記アンペアは付加された電位において測定する上記第10項記載の方法。

18、前記付加された電位は約0.2～約0.4ボルトである上記第17項記載の方法。

19、NAD<sup>+</sup>、ペーフルオロスルホン酸ポリマー、メチレンブルーおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなる電極コーティング組成物。

20、前記酵素はグルコースデヒドロゲナーゼである上記第19項記載の組成物。

21、前記コーティング組成物は、さらに、ポリビニルビロリドンおよびポリ酢酸ビニルラテックスを含有する上記第20項記載の組成物。

22、前記コーティングは、約～約 $\mu\text{m}$ のグルコースデヒドロゲナーゼ、約～約重量%のNAD<sup>+</sup>、約～約重量%のペーフルオロスルホン酸ポリマー、約～

11、前記外表面は、前記選択した化学的種の前記溶液でぬらす前に、日盛り定め剤溶液でぬらす上記第10項記載の方法。

12、前記選択した化学的種はグルコースであり、そして前記デヒドロゲナーゼ酵素はグルコースデヒドロゲナーゼである上記第10項記載の方法。

13、前記選択した化学的種はアルコールであり、そして前記デヒドロゲナーゼ酵素はアルコルデヒドロゲナーゼである上記第10項記載の方法。

14、前記コーティングは、さらに、水溶性樹脂のポリマーおよび硬化したエマルジョン接着剤を含有する上記第14項記載の方法。

15、前記水溶性樹脂のポリマーはポリビニルビロリドンであり、そして前記硬化したエマルジョン接着剤は硬化したポリ酢酸ビニルである上記第14項記載の方法。

16、前記コーティングは、約～約 $\mu\text{m}$ のグルコースデヒドロゲナーゼ、約～

約 重量%のメチレンブルーおよび約 ～約 重量%のポリ酢酸ビニルラテックスを含有する上記第20項記載の組成物。

23、NAD<sup>+</sup>、パーカルオロスルホン酸ポリマー、ポリビニルビロリドン、硬化したポリ酢酸ビニルラテックスおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなるコーティングをその上に有する導電性本体からなる感知装置のための電極。

24、前記導電性本体はグラファイトである上記第23項記載の電極。

25、前記コーティングは、約 ～約 重量%のNAD<sup>+</sup>、約 ～約 重量%のパーカルオロスルホン酸ポリマー、約 ～約 重量%の硬化したポリ酢酸ビニルラテックス、およびコーティングの1gにつき約 ～約 単位のグルコースデヒドロゲナーゼからなる上記第2・3項記載の電極。

26、前記コーティングは単一の層のコーティングである上記第23項記載の電極。

27、前記コーティングは多層コーティングか

らなり、ここで上記第2・3項記載の成分を含有する層がパーカルオロスルホン酸ポリマーから本質的に成る2層の間に挟まれている上記第2・3項記載の電極。

#### 4、図面の簡単な説明

第1図は、本発明のシステムにおいてキャリヤーの分解斜視図である。

第2図は、本発明の測定電極の拡大断面図である。

第3図は、2つの測定における時間に対する電流の変動を示すグラフであり、ここで測定量のグルコースを含有する試験溶液は5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め剤である。第1測定において、試験溶液は2ミリモルのグルコースを含有する。

第4図は、(1)グルコースを含有しない目盛り定め剤溶液、(2)5ミリモルのグルコースを含有する同様な溶液、および(3)同一量のグルコースおよび、さらに、mg/mlのメチレンブルーを含有する同様な溶液についての、加えた

電圧に対する電流の変動を示すグラフである。

第5図は、本発明の測定電極の他の実施形態の上部の拡大部分断面図である。

- 10 知装置
- 11 キャリヤー
- 12 板
- 13 毛管通路
- 14 入口端
- 16 出口端
- 17 上昇した部分
- 18 バックグラウンドアノード
- 19 カソード
- 21 測定アノード
- 22 円筒形ガイドスリーブ
- 23 多室シリダー
- 24 内部の槽
- 26 目盛り定め剤室
- 27 試料室
- 28 キャップ
- 29 ウェブ

#### 3.1 グラファイトプラグ

#### 3.2 試またはコーティング

#### 3.3 モート

#### 3.4 導電性トラック

#### 4.1 層

#### 4.2 層

特許出願人 アーデン・メディカル・システムズ

・インコーポレーテッド

代理人弁理士 小田島 平吉



界面の静音(内容に変更なし)

FIG. 1

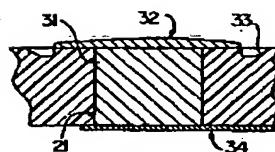
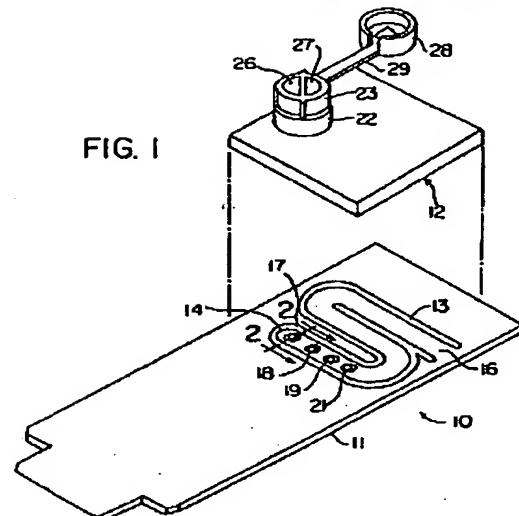


FIG. 2

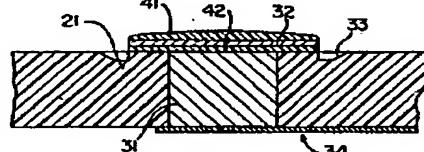


FIG. 5

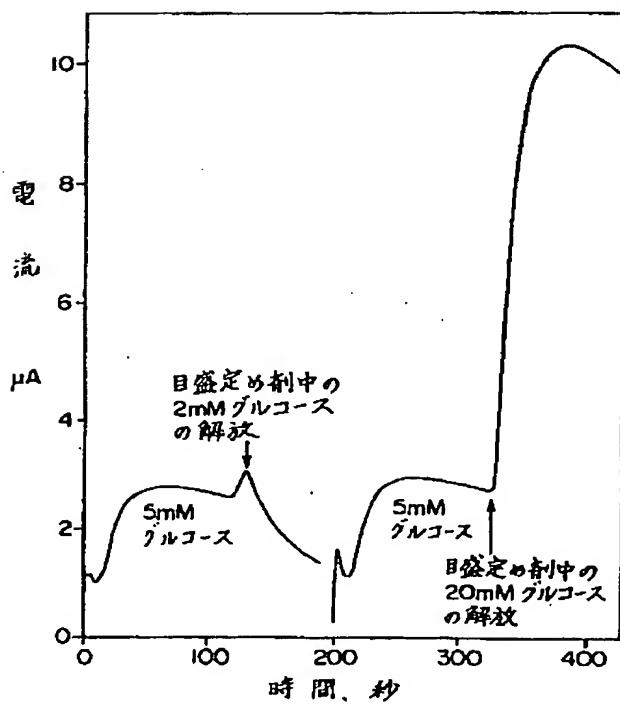


FIG. 3

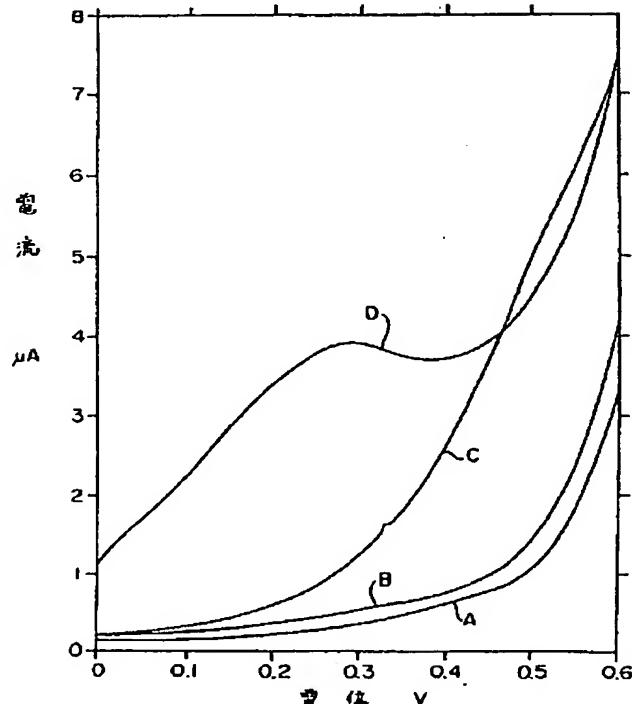


FIG. 4

第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>8</sup>  
G 01 N 27/416

識別記号

序内整理番号

⑥発明者 ウィリアム・ブイ・フ  
アウラー アメリカ合衆国ミネソタ州55417ミネアポリス・ノコミス  
アベニューA 4925

手続補正書

昭和63年10月6日

特許庁長官 古田文毅



1. 事件の表示

63-251735  
昭和63年10月5日提出の特許願

2. 発明の名称

水溶液中の酵素脱水素可能な化学的種の測定のためのセンサー

3. 指正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 アーデン・メティカル・システムズ・インコーポレーテッド

4. 代理人 宇107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号  
日本自動車会館  
氏名(6078)弁理士 小田島平吉  
電話 585-2256

5. 指正命令の日付 なし

6. 指正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄、発明の詳細な説明の欄及び図面の簡単な説明の欄並びに図面

7. 指正の内容

別紙のとおり(但し指正の対象に記載した事項以外は内容に変更なし)



63.10.7

## 明細書

## 1. 発明の名称

水溶液中の酵素脱水素可能な化学的種の測定のためのセンサー

## 2. 特許請求の範囲

1、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADH<sup>-</sup>から成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

2、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、水素化に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、

検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NADHおよびNADHから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

3、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、その溶波中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADPHから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

4、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶波中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、

のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

5、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶波中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶波でぬらし、前記溶波を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADPHより成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

7、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマー、メチレンブルーおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなる電極コーティング組成物。

8、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマー、ポリビニルビロリドン、硬化したポリ酢酸ビニルラテックスおよびデヒドロゲナーゼ酵素からなるコーティングをその上に有する導電性本体か

電極上のコーティングの外表面を前記溶波でぬらし、前記溶波を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADPHから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

5、水溶化に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶波中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶波でぬらし、前記溶波を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NADHおよびNADPHから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素

からなる感知装置のための電極。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、医学的装置に関する。とくに、本発明は、水溶波、とくに体液、例えば、全血液、血漿および尿の中の酵素脱水素可能なまたは水溶化可能な物質、例えば、グルコースまたはビルビン酸のレベルを、アンペア的に、測定するために使用する、臨床化学的分析装置に関する。

患者の血液または他の体液中のある種の化学的物質および/または生物学的物質のレベルを精確に、信頼性をもって、かつ迅速な情報を得ることが、現代の診断医学において、要求されている。

最も普通の決定の1つは、血液または尿中のグルコースの決定であり、そして、便宜上、以後の説明はグルコースのレベルの決定に集中される。

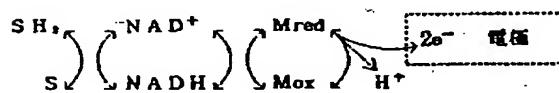
一回使用の感知装置を利用するこのような分析のために有用なシステムは、1987年3月31日付けの米国特許第4,654,127号(リチャード W. ベイカーおよびロウジャー L. フンク) (その開示を引用によってここに加え

る)に記載されている。

米国特許第4,654,127号の装置において、体液、例えば、血液または尿の試料を多室の受器の1つの室に入れ、一方目盛り定め剤の液体を受器の他の室に入れる。次いで、センサーの電極へ、まず、目盛り定め剤の液体を流れさせ、次いで試料試料を流れさせる。液体とセンサー電極との順次接触は電流を発生させ、この電流を測定しつつ関係づけて、試験液体中の特定の物質の濃度に関する所望の情報を得る。次いで、キャリア(carrier)を廃棄する。

米国特許第4,654,127号のシステムにおけるセンサー電極の各々は、ポリマーおよび電気的活性種を含むコーティングを有するものとして開示されており、ここでポリマーはセンサーの活性区域にわたって膜をつくり、そしてシステムの導電性表面に近くに電気的活性種を固定化する機能を有する。

また、溶液中のそのレベルを測定すべきある物質、例えば、グルコースは、適当なデヒドロゲナ



ここでSH<sub>2</sub>およびSは、その濃度を決定すべき種の、それぞれ、水素化および脱水素された形態を表わし、そしてMoxおよびMredは、それぞれ、仲介物質の酸化されたおよび還元された形態を表わす。

グルコースのレベルの電気化学的検出のための最も普遍のアッセイの系は、グルコースオキシダーゼの存在下に分子状酸素によりグルコースを酸化して、グルコール酸および過酸化水素を生成することを含む。電気化学的検出は、酸素の消費にあるいは過酸化物の発生に關係づけることができる。

いずれの場合においても、この機構の主要な欠点は酸素の利用可能性における制限である。この制限は、試験液体において直面することが期待される濃度の所望の直線の範囲のために、適切な酸素の供給を保証するために、予偏希釈を必要とす

一セ酵素の存在下に脱水素に対して感受性であること、およびこのような脱水素は電子を遊離し、これによって測定可能な電流を発生することは知られている。ほとんどの場合において、脱水素は直接電流に変換されないが、むしろ、コファクター、例えば、NADH (NAD<sup>+</sup>の還元された形態ニコチンアミドアデニジヌクレオトイド)、および仲介物質を含む反応の機構による。このようなシステムの一般的な化学は、次の論文において論じられている: ロ・ゴルトン (Lo Gorton)、「ニコチンアミド補酵素の電気触媒的酸化のための化学的変性した電極 (Chemical Modified of Nicotinamide Coenzymes)」、J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1., 1986, 82, 1245-1258 (その開示を引用によってここに加える)。ロ・ゴルトン (Lo Gorton) の論文における反応機構は、次によって表わされる:

る。さらに、全血液の測定は、ヘモグロビンの酸素緩衝能力のために、精確に測定することが非常に困難である。

あるいは、先行技術は、化学反応において酸素の代わりに仲介物質を使用し、これはセンサー電極上の膜またはコーティング中に挿入されて、予偏希釈の必要性を排除した。ベンゾキノンを仲介物質として選択する場合、グルコースとベンゾキノンとのグルコースオキシダーゼの存在下の反応はグルコール酸およびハイドロキノンを生成する。

この別法は、所望の(および測定する)反応がグルコースと分子状酸素との前述の反応と競争するという欠点を有する。こうして、異なる酸素濃度をもつ試料は、同一のグルコース濃度において異なる培養の応答を生成することができる。この妨害は全血液の測定において最も顕著である。

本発明の1つの面によれば、キャリアおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在

下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置が提供される。

本発明の他の面によれば、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法が提供される。

肝ましくは、コーティング組成物は、また、水

一ゼ酵素を含有せず、むしろ試験すべき体液のデヒドロゲナーゼ酵素の含量によって消費されることが期待される量を超える量において、測定すべき酵素による水素化または脱水素に対して感受性の種を含有する。

本発明のシステムにおいて、グルコース含量を、例えば、アンペアに翻訳するために必要な成分のすべては、グルコース含量の期待する直線の範囲のために適切な供給で、コーティング中に配合される。こうして、試料の予備希釈は不要である。

さらに、酵素は測定において含まれず、そして酵素の濃度はそれに影響を及ぼさない。

コーティング中のメチレンブルーの存在は、低い印加電圧における検出および測定を可能とし、こうしてより高い電位において酸化に感受性でありうる種からの妨害を排除する。

本発明のコーティングされた電極は、急速に応答し、2分以下の精確な測定を可能とする。

最後に、該の組成物は水溶液中に可溶性でなく、そして信頼性ある測定の実施を可能とするために

耐性樹脂のポリマー、例えば、ポリビニルビロリドン(P.V.P)および水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックス接着剤を含有する。

ある脱水素反応について、この分野において知られているように、コファクター(cofactor)として、NAD<sup>+</sup>の代わりにNADP<sup>+</sup>(ニコチンアミドアデニジスクレオドホスファート)を使用することが好ましいことがある。

本発明は、また、脱水素よりわむしろ、水素化に感受性である化学的種に、デヒドロゲナーゼ酵素、例えば、ビルビン脱の存在下の適用することができる。このような用途において、コファクターの水素化された形態、すなわち、NADHまたはNADPHをNAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>の代わりにコーティング組成物において使用する。

本発明の他の実施態様において、本発明は体液または他の水溶液中のデヒドロゲナーゼ酵素のレベルを検出するために使用できる。このような場合において、コーティング組成物はデヒドロゲナ

十分に長い期間の間その一体性を保持する。アニオン性バーフルオロスルホン酸ポリマーはカチオン性メチレンブルーを膜に結合すると信じられる。

本発明の感知電極は測定アノードであり、肝ましくは單一のカソードおよび地面上に電子を伝達する並列の2つの別々のアノードの1つである。他方のアノードは、「バックグラウンドアノード」と呼び、カソードおよび地面上に關して一定の電圧を維持する。こうして、この分野において知られているように、試験溶液に暴露されることによって起こる測定アノードにおける状態およびその上の電子の発生の変化は、アノードおよびカソードの間に印加する電圧に無視できる影響のみを有する。

測定アノードおよびバックグラウンドアノードの両者は、肝ましくはグラファイトから作る。カソードは、肝ましくは、錫から作り、そして酸化銀のコーティングを有する。前述のコーティング組成物でコーティングされるのは測定電極のみである。

バーフルオロスルホン酸ポリマーが唯一の樹脂成分であるコーティング組成物において、コーティングは目盛り定め剤 (calibrant) の液体および試験液体のそれを通過する急速な移送のためには密でありすぎる。こうして、このような組成物はより速い試験において使用することができるが、急速な読みを提供することを意図するシステムにおいては好ましくない。

コーティング組成物が、また、水溶性樹脂のポリマーを含む好ましい実施態様において、コーティング組成物は目盛り定め剤および試験溶液のそれを通す急速な移送を可能とする。

好ましい組成物は、また、乾燥のとき架橋した铸造体を形成する、水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックスを含有し、これによって改良された一体性を組成物に与える。

第1図は、本発明の感知装置10の全体の構成を示す。この装置は、強靭な、非導電性プラスチック材料、例えば、アクリロニトリル-ブタジエン-ステレン-コポリマー (ABS) から作られた、

円筒形ガイドスリーブ22は、入口17より上に板18の1つの角に取り付けられている。多室シリンダー23はスリーブ22内に回転するよう取り付けられており、そして内部の壁24を有し、この壁はシリンダーを、目盛り定め剤液体を含有する目盛り定め剤室26と血液または他の体液の試料を受取る試料室27とに分割する。目盛り定め剤溶液は室26内に工場で密閉され、そしてセンサーによって測定すべき、既知濃度のグルコースを含有する。キャップ28は、ウェブ29によってシリンダー23へ接続されており、そして試料室27が体液試料を受取った後、シリンダー23の上端より上に配置される。

測定アノード21は、第2図に断面図で示されており、グラファイトプラグ31、好ましくはグラファイトプラグから切ったシリンダーからなり、このプラグはカソード11のプラスチック材料中に孔を通して延びている。膜またはコーティング32は、プラグ31の1つの表面をカバーし、そしてそこから短い距離でプラグを取囲むモート3

開性のカードの形態キャリヤー11、およびその一端をカバーする板12を含む。板12は、一般に、透明なプラスチック材料から作られるが、透明性は必須ではない。

キャリヤーの一端に、板より下に、毛管通路13が存在し、これはS字形であり、そしてキャリヤー11の上表面と実質的に平坦なS字形カバーの下表面との間の狭い空間によって定められる。毛管通路13は入口端14と出口端16との間を走行する。入口端に、「ブラウ (plow) と呼ぶ、S字形の毛管通路のカバーの上昇した部分17が存在する。そのブラウの機能は、後述するように、目盛り定め剤および試験溶液を保持するはくに孔を開け、そしてこれらの溶液を、連続的に、毛管通路の入口14に入らせることがある。バックグラウンドアノード18、カソード19および測定アノード21は、毛管通路内に、その入口に隣接して、存在し、そして各々は、測定アノード21について第2図に示すように、「モート (seal)」33によって取囲まれている。

3に至る。キャリヤー11の両方の面における導電性トラック34は、測定アノードにおいて発生した電子を感知装置内の接点へ導き、そして実験的に所望の読みを提供するマイクロプロセッサへ導く。

バックグラウンドアノード18は、コーティングまたは膜をもたない以外、測定アノード21に類似する。カソード19はキャリヤー11を通して延びる銀のプラグであり、その上表面は塩化銀の薄い層でコーティングされている。

コーティング32は、前述のように、少なくともグルコースデヒドロゲナーゼ (グルコースが測定すべき化学物であるとき)、メチレンブルー [3,7-ビス (ジメタルアミノ) フェノチアジン-5-イウムクロライド] およびバーフルオロスルホン酸ポリマーからなる。

使用できる適当なバーフルオロスルホン酸ポリマーは、少なくとも約900の等価重量 (equivalent weight) を有するものである。少なくとも約1100の等価重量は好ましい。

バーフルオロスルホン酸溶液は、イー・アイ・デュポン社から商標ナフィオン (Nafion<sup>®</sup>) で商業的に販売されており、そして、また、マーチン (Martin) らの手稿 [Anal. Chem., Vol. 54, 1639 (1982)] によって調整することができる。

好みしくは、コーティング組成物は、また、水溶性樹脂のポリマー、例えば、ポリビニルピロリドンを含有する。この材料の存在は、コーティングまたは膜を、試験溶液の透過性をより上くし、そして読みをより速くする。

ポリビニルピロリドン (PVP) が水溶性ポリマーであるとき、それは、一般に、約 10,000 を越える、好みしくは約 300,000 を越える平均分子量を有する。

使用できる他の適当なポリマーは、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴムおよびアルギン酸などを包含する。

さらに、好みしいコーティング組成物は、また、

し、次いで乾燥させる。測定電極を取りむモートは、電極のへりにおいて鋭い表面を形成し、これによって、表面張力により、コーティング組成物のための鋭い境界を形成し、その広がりを精确に電極の区域に限定する。

グラファイトは油性または疏水性の表面を有するが、驚くべきことには、水性コーティング組成物はそれによってはじかれないこと、およびコーティングは、乾燥後、それに接着性であることがわかった。

コーティングを乾燥すると、それは、典型的には、コーティングの 1 $\mu$ につき、約 4000 ~ 約 8000 単位のグルコースデヒドログナーゼ (またはその約 8 ~ 約 16 重量%)、約 7.5 ~ 約 8.7 重量% の NAD<sup>+</sup>、約 2 ~ 約 6 重量% のメチレンブルーおよび約 2 ~ 約 4 重量% のバーフルオロスルホン酸ポリマーを含有する。さらに、コーティングは、0 ~ 約 7 重量%、好みしくは約 2 ~ 約 4 重量% の水溶性ポリマー、および 0 ~ 約 5 重量%、好みしくは約 1 ~ 約 3 重量% の硬化したエマルジョ

水性エマルジョン接着剤、例えば、ポリ酢酸ビニルラテックス接着剤を含有する。この物質は、決足酵母のとき架橋して硬化し、これによって追加の一體性を決定酵母したコーティングに付与し、コーティングが試験溶液で温潤したときの崩壊を少なくすると思われる。

使用できる他の水性エマルジョン接着剤は、アクリレートおよびメタクリレートエステルのラテックスポリマーを包含する。

約 1000 の使い捨てキャリヤーのための測定アノードの調整に十分な、典型的なコーティング組成物は、約 2000 ~ 約 3500 単位のグルコースデヒドログナーゼ (または 50 単位 / mg 活性に基いて約 0.04 ~ 約 0.07 g)、約 0.2 ~ 約 0.5 g のニコチニアミドアデニンジスクレオド、約 0.01 ~ 約 0.03 g のメチレンブルーおよび約 1 ~ 約 2 ml のバーフルオロスルホン酸ポリマーを 1.25 重量% のポリマーを含有するメタノール中の溶液として含有する。

コーティング組成物を測定電極の上表面に適用

ン接着剤を含有する。

コーティングは、乾燥後、一般に、約 2 ~ 約 4 ミル、好みしくは約 3 ~ 約 3.5 ミルの厚さを有する。

特定の実施態様において、約 1000 の電極のためのコーティング組成物は、次の成分からなる：

- 1) グルコースデヒドログナーゼ、2235 単位、
- 2) ニコチニアミドアデニンジスクレオド、ナトリウム塩、0.298 g、
- 3) メチレンブルー、0.175 g、
- 4) ポリビニルピロリドン (水中 1%)、1.300 g、
- 5) ポリ酢酸ビニルラテックス (水中 2.1%)、0.388 g、
- 6) バーフルオロスルホン酸ポリマー (水中 1.25%)、1.313 ml。

コーティング組成物は、好みしくは、約 500 ~ 約 1000 単位 / ml のグルコースデヒドログナーゼ、約 9 ~ 約 15 重量% の NAD<sup>+</sup>、約 0.3

～約0.6重量%のバーフルオロスルホン酸ポリマー、約0.4～約0.9重量%のメチレンブルーおよび約0.1～約0.6重量%のポリ酢酸ビニルラテックスを含有する。組成物の残部は溶媒、主として水である。

グルコースデヒドログナーゼ、NAD<sup>+</sup>およびメチレンブルーを、まず、水性ポリビニルビロリドン溶液中に攪拌しながら溶解する。次いで、ポリ酢酸ビニルラテックスを、完全に配合するまで攪拌しながら、添加する。組成物が攪拌されている間、バーフルオロスルホン酸ポリマー溶液を滴々添加する。1～2分にわたる、この成分のゆっくりした添加は、ポリマーをコーティング組成物内に微細に分散させるために必要である。

この段階におけるコーティング組成物の外観は、一般に、非常に暗い青であり、分散した微細な黒い粒子を含む。

操作における測定電極の性質を、第3図および第4図に示す。第3図は2種類の試験に関する。それは、第1試験において、電極におけるアンペ

アのアンペアの増加を示す。これに引続いて、第2試験溶液が解放されるとき、120秒後、アンペアは大きく増加し、試験溶液が目盛り定め剤溶液中に配合され、それと置換されるとき、溶液のグルコースは上昇しはじめる。約180秒の後、約10ミリアンペアのピークアンペアが得られ、この時、この位置の上にアノードが読み取られ、そして目盛り定め剤溶液についてのアンペアの読みと関係づけられて、試験溶液の所望の読みが得られる。

前述の特定のコーティング組成物を使用して作られた、第3図の試験において使用した特定のシステムについて、試験溶液のアンペアの読みについての最適な時間は、目盛り定め剤溶液の解放後約180秒および試験溶液の解放後約60秒である。他のコーティング組成物を使用すると、最適な読み取り時間は目盛り定め剤溶液の解放後2分程度に短い時間から20分またはそれ以上までに変化するであろう。

第4図は、4つの別々の曲線を含有し、そして

アを示し、電極が、まず、5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め剤溶液に暴露され、次いで(120秒後)2ミリモルのグルコースを含有するようにつくられた試験溶液に暴露されるとき、アンペアは変動する。第2試験は、同様であるが、試験溶液は20ミリモルのグルコースを含有するようにつくられる。

第3図の左の曲線を左から右に読むと明らかのように、電極は、最初、不規則な未知の電気的「ノイズ」の理由によって、少量の電流(約1ミリアンペア)を発生し、そして電流は、約60秒以内に、目盛り定め剤溶液が電極に到達するにつれて、3ミリアンペアに近くまで上昇する。

試験溶液が解放されると、約120秒後、混合作用によるアンペアの瞬間的なわずかの上昇が存在し、次いで、試験溶液が目盛り定め剤溶液を差し、そのグルコース含量を低下させるにつれて、アンペアは一定して低下する。

これと対照的に、右の曲線は、また、目盛り定め剤溶液が電極に到達するときの、最初の60秒

グルコースを含有しない目盛り定め剤(曲線AおよびB)について、および5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め剤(曲線CおよびD)について、印加した電位を変化させて、測定した電流の変動を示す。曲線AおよびCは、アノードのコーティングがメチレンブルーを含有しないシステムを表す。曲線BおよびDは、コーティングが以後の特定の実施例に記載する量でメチレンブルーを含有するシステムを表す。

理解できるように、曲線AおよびCの間ににおいて、曲線BおよびDの間ににおけるより、大きい差が存在し、そして曲線AおよびBにおける電流のレベル(グルコースに起因しない電流を示す)はより高い電圧において許容されないほどに高い。曲線も示すように、コーティング組成物中のメチレンブルーの存在は、その不存在において得ることができるよりも、より大きい感度および精度を試験に与える。最適な結果は約0.2～約0.4ボルトの電位を付与したとき得られることを曲線が示している。

特開平2-1535(18)

第5図は、極端な精度が読みの速さを犠牲にして生まれるとき、有用である本発明の他の実施例を示す。第5図において、第2図に類似する要素は同様な参照数字を有し、そして理解できるように、この実施例における反応成分含有コーティング32グラファイトアノードおよび適用した試験液と直接接触しない。むしろ、反応成分含有コーティングはバーフルオロスルホン酸ポリマーの2層41および42の間に統まれる。水性媒質中の崩壊に対するバーフルオロスルホン酸ポリマー層の抵抗は、試験液体のアノードへの浸透を遅くし、そしてコーティングのアセンブリーに一体性を付与するので、コーティングのアセンブリーは要求するより長い接触期間のために耐久性を保持する。

第5図の実施例は、例えば、極端な精度を保証しあつ読みの測定が二次的な重要性をもつ決定、例えば、血液中のエチルアルコールのレベルの決定にとくに有用である。

以下の表は、電流を発生するためにグルコース

オキシダーゼ反応を利用する、商業的に入手可能なグルコースのアンペア測定システムと比較した、本発明のシステムの性能の特性を提供する。

表

|          | 先行技術の<br>システム   | 本発明の<br>システム        |
|----------|-----------------|---------------------|
| 精度       |                 |                     |
| 血漿       | 3-8%            | 3-5%                |
| 全血液      | 6-10%           | 3-5%                |
| 全血液を使用する |                 |                     |
| 最低の検出レベル | 3ミリモル/4         | 1ミリモル<br>以下/8       |
| 最高の検出レベル | 20ミリモル/4        | 30-35<br>ミリモル<br>/4 |
| 検索の妨害    | 大きい、酸素<br>の抑制信号 | なし                  |
| 全血液を使用する |                 |                     |
| 温度の影響    | 大きい             | 微弱のシス<br>テムのわず      |

かに1/4

| 精度  | かに1/4          |               |
|-----|----------------|---------------|
| 血漿  | 1ミリモル/8        | 1ミリモル以<br>下/8 |
| 全血液 | ±1.5ミリ<br>モル/8 | 1ミリモル以<br>下/8 |

操作において、まず、体の試料を室27に挿入し、次いで室をキャップ28で密閉し、そして感知部における適当なスロット中にこのカードアセンブリーを挿入する。次いで、キャップ28およびシリンドラー23を開始位置から90°だけ回し、これによってブラウ17による孔開けに上って室26の底において箱のシールを破り、そして室26から目盛り定め剤の液体を毛管通路13の中に流入させ、ここで目盛り定め剤の液体は3つのすべての電極18、19および21と接触する。目盛り定め剤の液体の流れが、液体ヘッドの減少および表面張力のために、停止したとき、目盛り定め剤の試験の読みを分析装置によって目盛り定め剤のグルコースレベルに応答して行う。いった

んこの読みがなされると(一般に約120秒後)、キャップ28およびシリンドラー23をもう一度この時は180°だけ試料の試験位置へ回し、ここで室27の底における箱のシールをブラウ17によって孔開けし、そして試験液体は毛管通路13の入口14の中に流入する。

試験液体は、この時点において、電極18、19および21を含有する毛管通路3の部分において目盛り定め剤液体を置換する。毛管通路中の試験液体の流れは、また、液体ヘッドの減少および毛管作用のために、停止し、そして最後の測定は分析装置によってなされる。センサーの読みに基づいて、目盛り定め剤の液体が測定電極21と接地したときおよび試験液体が測定アノード21と接触したとき、分析装置は試験液体中のグルコースの濃度を誘導する。

本発明は、主として、グルコースレベルの決定に関して説明した。しかしながら、本発明は、適当なデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に脱水素されるまたは水素化される他の化学種、例えば、

エタノール、乳酸塩、ビルペート、コレステロール、スレエート、グリセロールおよびグルタメート、ビルビン酸塩、コレステロール、りんご酸塩、グリセロールおよびグルタミン酸塩などを検出するするために使用できる。

本発明を肝ましい実施態様を参照して説明したが、本発明の教示および範囲を逸脱しないで、種々の変化および変更が可能である。

本発明の主な態様および特徴は、次の通りである。

1、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、脱水素に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NADHおよびNADPから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

2、前記酵素はグルコースデヒドロゲナーゼである上記第1項記載の感知装置。

3、前記コーティング組成物は水溶性樹脂のポリマーを含有する上記第1、2および3項のいずれかに記載の感知装置。

4、前記水溶性樹脂のポリマーはポリビニルビロリドンからなる上記第5項記載の感知装置。

5、前記コーティング組成物は水性エマルジョン接着剤を含有する上記第1、2および3項のいずれかに記載の感知装置。

6、前記接着剤はポリ酢酸ビニルラテックスからなる上記第7項記載の感知装置。

7、前記コーティングは約2～約4ミルの厚さを有する上記第1、2および3項のいずれかに記載の感知装置。

8、前記コーティングは約4000～約8000単位/ $\mu$ のグルコースデヒドロゲナーゼを含有し、そして約75～約87重量%のNAD<sup>+</sup>、

グされていることを特徴とする前記感知装置。

9、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、水溶化に対して感受性の選択した化学的種のレベルをその溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NADHおよびNADPから成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティングされていることを特徴とする前記感知装置。

10、キャリヤーおよび少なくとも2つの電極からなり、その溶液中においてそのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に、アンペア測定的に、検出できる臨床化学的分析装置と一緒に使用するための1回使用の感知装置において、前記電極の1つは、メチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADP<sup>+</sup>から成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなる組成物でコーティング

約2～約4重量%のバーフルオロスルホン酸ポリマーおよび約3～約6重量%のメチレンブルーを含有する上記第4項記載の感知装置。

11、前記コーティングは、さらに、約2～約4重量%のポリビニルビロリドンおよび約1～約3重量%の硬化したポリ酢酸ビニルを含有する上記第10項記載の感知装置。

12、脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドロゲナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電圧を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADP<sup>+</sup>から成る群のコファクター、バーフルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

13. 水素化に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドログナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流のアンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADP<sup>+</sup>より成る群のコファクター、パーカルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

14. 脱水素に対して感受性の選択した化学的種の濃度を、水溶液中において、そのためのデヒドログナーゼ酵素の存在下に決定する方法であって、電極上のコーティングの外表面を前記溶液でぬらし、前記溶液を前記コーティングを通過させて前記電極と接触させ、そして前記電極と他の電極との間の電流を生成させ、その後、前記電流の

を含有する上記第12、13および14項のいずれかに記載の方法。

15. 前記水溶性樹脂のポリマーはポリビニルビロリドンであり、そして前記硬化したエマルジョン接着剤は硬化したポリ酢酸ビニルである上記第18項記載の方法。

16. 前記コーティングは、約4000～約8000単位/gのグルコースデヒドログナーゼ、約7.5～約8.7重量%のNAD<sup>+</sup>、約3～約6重量%のパーカルオロスルホン酸ポリマーおよび約2～約4重量%のメチレンブルーを含有する上記第19項記載の方法。

17. 前記アンペアは付加された電位において測定する上記第12、13および14項のいずれかに記載の方法。

18. 前記付加された電位は約0.2～約0.4ボルトである上記第21項記載の方法。

19. NAD<sup>+</sup>、パーカルオロスルホン酸ポリマー、メチレンブルーおよびデヒドログナーゼ酵素からなる電極コーティング組成物。

アンペアを測定することからなり、前記コーティングはメチレンブルー、NAD<sup>+</sup>およびNADP<sup>+</sup>より成る群のコファクター、パーカルオロスルホン酸ポリマーおよび前記選択した化学的種の脱水素のための酵素からなることを特徴とする前記方法。

20. 前記外表面は、前記選択した化学的種の前記溶液でぬらす前に、目盛り定め剤溶液でぬらす上記第12、13および14項のいずれかに記載の方法。

21. 前記選択した化学的種はグルコースであり、そして前記デヒドログナーゼ酵素はグルコースデヒドログナーゼである上記第12項記載の方法。

22. 前記選択した化学的種はアルコールであり、そして前記デヒドログナーゼ酵素はアルコールデヒドログナーゼである上記第12項記載の方法。

23. 前記コーティングは、さらに、水溶性樹脂のポリマーおよび硬化したエマルジョン接着剤

24. 前記酵素はグルコースデヒドログナーゼである上記第23項記載の組成物。

25. 前記コーティング組成物は、さらに、ポリビニルビロリドンおよびポリ酢酸ビニルラテックスを含有する上記第23項記載の組成物。

26. 前記コーティングは、約500～約1000単位/gのグルコースデヒドログナーゼ、約9～約15重量%のNAD<sup>+</sup>、約0.3～約0.6重量%のパーカルオロスルホン酸ポリマー、約0.4～約0.9重量%のメチレンブルーおよび約0.1～約0.6重量%のポリ酢酸ビニルラテックスを含有する上記第24項記載の組成物。

27. NAD<sup>+</sup>、パーカルオロスルホン酸ポリマー、ポリビニルビロリドン、硬化したポリ酢酸ビニルラテックスおよびデヒドログナーゼ酵素からなるコーティングをその上に有する導電性本体からなる感知装置のための電極。

28. 前記導電性本体はグラファイトである上記第27項記載の電極。

29. 前記コーティングは、約7.5～約8.7重

特開平2-1535 (21)

量%のNAD<sup>+</sup>、約2～約4重量%のバーフルオロスルホン酸ポリマー、約1～約3重量%の硬化したポリ酢酸ビニルラテックス、およびコーティングの1gにつき約4000～約8000単位のグルコースステヒドロゲナーゼからなる上記第27項記載の電極。

30、前記コーティングは単一の層のコーティングである上記第27項記載の電極。

31、前記コーティングは多層コーティングからなり、ここで上記第27項記載の成分を含有する層がバーフルオロスルホン酸ポリマーから本質的に成る2層の間に挟まれている上記第27項記載の電極。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のシステムにおいてキャリヤーの分解能視図である。

第2図は、本発明の測定電極の拡大断面図である。

第3図は、2つの測定における時間に対する電流の変動を示すグラフであり、ここで測定量のグ

ルコースを含有する試験溶液は5ミリモルのグルコースを含有する目盛り定め剤である。第1測定において、試験溶液は2ミリモルのグルコースを含有する。

第4図は、グルコースを含有するか、あるいは含有しない目盛り定め剤について、およびメチレンブルーを含有するか、あるいは含有しない目盛り定め剤について、印加した電圧に対する電流の変動を示すグラフである。

第5図は、本発明の測定電極の他の実施態様の上部の拡大部分断面図である。

特許出願人 アーデン・メディカル・システムズ・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平吉



#### 手続補正書 (方式)

平成1年3月7日

特許庁長官 吉田文毅殿

#### 1. 事件の表示

昭和63年特許第251736号

#### 2. 発明の名称

水溶液中の酵素脱水素可能な化学的種の測定のためのセンサー

#### 3. 指正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 アーデン・メディカル・システムズ・インコーポレーテッド

#### 4. 代理人 〒107

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自動車会館

氏名 (6078)弁理士 小田島平吉

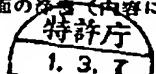
電話 585-2256



#### 5. 指正命令の日付 平成1年1月31日(発送日)

#### 6. 指正の対象 願書の特許出願人の権、委任状及びその訳文並びに図面

#### 7. 指正の内容 別紙のとおり 図面のとおり(内容に変更なし)



1.3.7